

PCT/KR 03 / 00882
RO/KR 01. 05. 2003



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0005603
Application Number

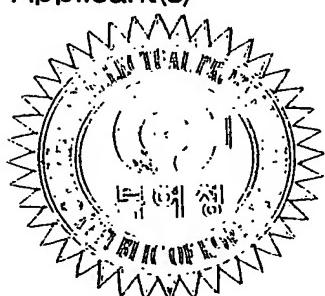
REC'D 20 MAY 2003
WIPO PCT

출 원 년 월 일 : 2003년 01월 28일
Date of Application JAN 28, 2003

출 원 인 : 주식회사 두산
Applicant(s) DOOSAN CORPORATION

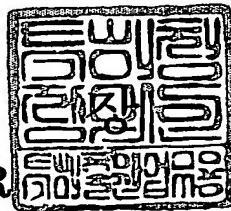
BEST AVAILABLE COPY

2003 년 05 월 01 일



특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.28
【발명의 명칭】	엔 ,엔-디메칠피토스핑고신을 함유한 항암제 조성을 Composition for treating cancer containing N,N-dimethylphytosphingosine
【발명의 영문명칭】	
【출원인】	
【명칭】	주식회사 두산
【출원인코드】	1-1998-000923-6
【대리인】	
【성명】	최원현
【대리인코드】	9-1998-000569-6
【포괄위임등록번호】	2002-054700-0
【대리인】	
【성명】	김영철
【대리인코드】	9-1998-000040-3
【포괄위임등록번호】	2002-054699-7
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최진희
【성명의 영문표기】	CHOI, Jin Hee
【주민등록번호】	740222-2792411
【우편번호】	130-062
【주소】	서울특별시 동대문구 제기2동 1193 22/4
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박장서
【성명의 영문표기】	PARK, Chang Seo
【주민등록번호】	540811-1066814
【우편번호】	427-040
【주소】	경기도 과천시 별양동 주공아파트 710-401
【국적】	KR



030005603

출력 일자: 2003/5/12

【발명자】

【성명의 국문표기】	김진욱
【성명의 영문표기】	KIM,Jin Wook
【주민등록번호】	651120-1009923
【우편번호】	449-846
【주소】	경기도 용인시 수지읍 풍덕천리 699 한국아파트 102-306
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	박창열
【성명의 영문표기】	PARK,Chang Yeol
【주민등록번호】	680508-1119712
【우편번호】	449-020
【주소】	경기도 용인시 서구 김량장동 338-6 태성아파트 301호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	황유아
【성명의 영문표기】	HWANG, You-A
【주민등록번호】	760624-2082019
【우편번호】	464-892
【주소】	경기도 광주군 오포면 능평리 401-1
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	김은주
【성명의 영문표기】	KIM,Eun Ju
【주민등록번호】	760804-2167423
【우편번호】	449-905
【주소】	경기도 용인시 기흥읍 상갈리 122-23 영진빌라 302호
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】	고의찬
【성명의 영문표기】	KOH,Ui Chan
【주민등록번호】	501023-1011721

030005603

출력 일자: 2003/5/12

【우편번호】 135-010

【주소】 서울특별시 강남구 논현동 105 동현아파트 1-201

【국적】 KR

【우선권주장】

【출원국명】 KR

【출원종류】 특허

【출원번호】 10-2002-0024245

【출원일자】 2002.05.02

【증명서류】 미첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인
최원
현 (인) 대리인
김영철 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 17 면 17,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 0 황 0 원

【합계】 72,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 항암제 조성물 및 그를 포함한 암 치료용 키트에 관한 것으로서, 상기 항암제 조성물은 N,N-디메칠피토스핑고신을 함유한 것을 특징으로 한다. 본 발명에 의한 조성물을 이용하면, 스팅고신키나제의 활성을 억제할 수 있으므로 스팅고신키나제가 유발하는 많은 메커니즘을 차단할 수 있다. 예컨대 스팅고키나제에 의해 세라마이드와 스팅고신이 인산화되는 것을 막음으로써 세라마이드와 스팅고신의 농도를 높게 유지할 수 있고 그러한 세라마이드와 스팅고신에 의해 암세포에서 아폽토시스가 유발되므로 암을 치료 또는 예방할 수 있다. 또한 스팅고신키나제의 세포 증식 촉진 활성을 억제함으로써 과증식성 질환, 예컨대 암과 건선 등을 치료 또는 예방할 수 있다. 또한 본 발명에 의한 조성물은 프로테인키나제 C의 활성을 억제함으로써 프로테인키나제 C가 유발하는 많은 메커니즘을 차단할 수 있다. 그 중에서도 특히 염증을 억제하는 효과가 우수하므로 다른 항암제와 조합하여 투여하는 경우 우수한 항암효과를 기대할 수 있다. 또한 본 발명에 의한 조성물은 그 자체로도 우수한 아폽토시스 활성을 갖기 때문에 아폽토시스가 요구되는 상황에서 단독으로 유효성분으로서 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 의한 조성물은 항균 활성이 우수한 효과가 있다.

【대표도】

도 3

【색인어】

아폽토시스, 스팅고신키나제, 프로테인키나제, 항암제

【명세서】**【발명의 명칭】**

엔, 엔-디메칠피토스핑고신을 함유한 항암제 조성물{Composition for treating cancer containing N,N-dimethylphytosphingosine}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신(DMPS)의 ^1H NMR 스펙트럼이다.

도 2는 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 MALDI-MASS 스펙트럼이다.

도 3은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 스팅고신키나제 억제효과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 HL60 세포주에서의 아폽토시스 유도 효과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 HaCaT 세포주에서의 아폽토시스 유도 효과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 LLC-PK1에서의 아폽토시스 유도 효과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 B104 세포주에서의 아폽토시스 유도 효과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신의 MDA-MB-231 세포주에서의 아폽토시스 유도 효과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스狞고신의 DNA 단편화 효과를 나타내는 전기영동 결과이다.

도 10은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스狞고신에 의한 안티-히스톤 항체 결합력 증가 효과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스狞고신에 의한 PKC 저해효과를 나타내는 그래프이다.

도 12는 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스狞고신의 항균 활성을 나타내는 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <13> 본 발명은 디메칠피토스狞고신 함유 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 스폁고신키나제 억제 활성, 프로테인키나제 C(PKC) 억제 활성, 아폽토시스 유도 활성, 과증식성 질환 치료 활성, 항암 활성, 항염 활성, 항균 활성을 갖는 조성물에 관한 것이다.
- <14> 암은 현재 사망률이 1위인 난치병이며 최근들에 발병율이 점점 증가하고 있는 추세이다. 암의 치료법으로는 수술, 방사선 치료, 화학요법이 있으며 50% 정도만의 완치율을 보이고 있다. 암은 발생 초기에 발견될 경우 수술이나 방사선 요법으로 완치도 가능하나 진행된 암의 경우에는 화학요법제를 주로 사용한다. 그러나 화학요법제의 치료효과가

타질환에 비해 낮은 것은 부작용으로 인해 투여기간 및 투여량에 제한이 있으며, 약제 내성이 쉽게 발생하기 때문이다.

<15> 최근 많은 연구를 통하여 항암제 개발의 작용점(Target)이 다양해지면서, 부작용이 적으며 효과가 좋은 약제들이 개발되고 있다. 또한 프로테인키나제 등을 항암제와 함께 사용하여 항암제에 대한 효과를 증진시키는 증진제에 대한 연구도 많이 진행되고 있다.

<16> 항암제 개발의 최종 목표는 정상세포에는 작용하지 않으면서 암세포에 선택적으로 작용하는 약제와 약제내성이 생긴 암세포에도 작용하거나, 약제내성을 생기게 하지 않는 약제의 개발일 것이다.

<17> 현재 개발된 대부분의 항암제의 작용기전은 암세포내의 세라마이드의 풀을 높여 암세포의 사멸효과를 가져오는 것이다.

<18> 항암제 처리에 의한 암세포의 사멸기전은 다음과 같이 해석된다. 항암제나 방사선 조사 등 외부자극이 가해지면 스팽고미에린의 분해가 유발되면서 세포내 세라마이드와 스팽고신의 농도가 높아지고, 이에 의해 세포는 아폽토시스로 진행된다. 그러나 스팽고신이 스팽고신키나제의 작용에 의해 인산화스팡고신으로 전환되면 아폽토시스가 아닌 성장으로 유도되어 오히려 암세포가 증식하게 되는 현상이 나타난다. 한편 최근 글리코실 세라마이드 합성효소(Glycosylceramide synthase)에 의해 글리코실 세라마이드가 많이 합성되면 약제 내성을 띄게 된다는 보고도 있다.

<19> 항암제의 작용기작은 결과적으로는 암세포내 세라마이드의 농도변화를 유발하는 것이다. 특히 암세포의 경우는 세라마이드의 함량이 정상세포에 비해 낮은 것

으로 보고되면서 세라마이드의 농도를 높이거나 분해를 억제하는 물질이 항암제로서 개발 가능성이 매우 큰 것으로 기대되고 있다. 이에 따라 세라마이드의 대사 경로에서 다양한 목표를 선정할 수 있다. 우선 세라마이드 합성효소(Ceramide synthase)에 영향을 주어 세라마이드의 신규 합성을 증가시키는 것을 들 수 있다. 현재까지 알려진 물질로는 팍리탁셀(Paclitaxel), 에토포시드(Etoposide), 안트라사이클린(Anthracyclines), 빈카알칼로이드(Vinca alkaloids), C6-세라마이드(C6-Ceramide), TNF- α , SDZ PSC 833 등이 있다. 또 다른 항암제 개발 목표로는 스팽고미에리나제(Sphingomyelinase)에 영향을 주어 스팽고미에린의 분해를 촉진하여 세라마이드의 함량을 높이는 방법이 있다. 이러한 효과가 알려진 것으로는 방사선조사를 포함하여 CD-95, 안트라사이클린(Anthracyclines), TNF- α , Fas 리간드(ligand), Ara-C 등이 있다. 세포내 세라마이드의 함량을 높여주는 방법도 중요하지만 생성된 세라마이드의 분해를 방지하는 것도 좋은 개발 목표가 될 수 있다. 이 중 약제내성을 유발하는 글리코실 세라마이드의 합성을 억제하는 것은 항암제의 효과를 증진시키는데 효과적으로 사용될 수 있다. 현재까지 알려진 물질로는 타목시펜(Tamoxifen), 토레미펜(Toremifene), 미페프리스톤(Mifepristone), 사이클로스포린 에이(Cyclosporin A), 케로코나졸(Keroconazole), 베라파밀(Verapamil), PPMP 등이 있다. 이러한 물질은 단독으로 보다는 세라마이드의 생성을 촉진하는 물질과 함께 사용되어 항암제의 효과를 증진시키는 효과를 가져올 수 있을 것이다. 또 다른 세라마이드의 분해를 억제하는 방법으로는 스팽고신키나제의 활성을 억제하거나 인산화스핑고신의 인산기를 떼어줌으로써 다시 스팽고신으로 전환시키는 스팽고신 포스파타제(sphingosine phosphatase)를 활성화 시키는 방법이다. 스팽고신키나제의 활성을 억제시키는 물질은 디메칠스핑고신이 대표적인 것이다. 이외에 프로테인키나제 억제제 등도 항

암제와 동시에 사용되어 암세포 사멸효과를 증진시키는 것으로 알려지고 있어 최근에는 이러한 여러가지 작용기전의 약제를 동시에 사용하여 항암효과를 극대화시키고자 하는 연구가 많이 진행되기 시작하였다.

<20> 세라마이드의 분해를 억제하는 물질은 세포에 영향을 주지 않는 양을 처리하여 항암제와의 동시 사용에 의한 시너지 효과를 얻을 수 있으므로 부작용의 위험도 줄일 수 있다.

<21> 세라마이드와 탁솔(Taxol)을 함께 처리한 경우 헤드 앤 넥(Head and Neck) 암세로의 아폽토시스를 증가시키는 것으로 보고된 바 있다. 또한 직장암세포는 세라마이드의 함량이 정상세포의 50%에 불과한 것으로 알려졌고 강력한 세라미다제 저해제를 사용하여 아폽토시스가 유발되는 것이 확인되었다. 특히 세라미다제 저해제는 암세포에 대한 선택성이 없으므로 항암제의 좋은 타겟이 될 수 있다. 또한 사핑콜(Safingol : L-threo-dihydrosphingosine)을 프로테인키나제 억제제로서 항암제인 독소루비신(Doxorubicin)과 함께 사용할 경우 항암효과가 증가되는 임상결과도 있다. 한편 NIH 3T3 피브로브라스트에서 스팽고신키나제를 발현시켰을 때 세포의 분열속도가 빨라지고 형질전환된 양상을 띠는 것으로 보아 스팽고신키나제가 온코진(Oncogene)의 성격을 가지는 것으로 추측할 수 있다. 더불어 스팽고신키나제의 발현증가는 아폽토시스를 방지하는 것으로 보고되어 스팽고신키나제 저해제가 항암제로 쓰일 수 있음을 암시해 주고 있다.

<22> 본 연구의 선행연구로는 여러가지가 보고되어 있다. 프로테인키나제의 경쟁적 억제제인 사핑콜(Safingol : L-threo-dihydrosphingosine)을 독소루비신(Doxorubicin)이나 미토마이신 C(Mitomycin C)와 함께 사용하면 암세포 사멸효과가 증가되며, 항암제 내성을 떤 세포주에서도 세포독성을 띠는 것으로 밝혀졌다(USP. 6,444,638, USP. 5,821,072

등). 또한 USP No. 6,368,831 등에 의하면 세라마이드 분해 억제제를 세포과증식 질병의 치료에 사용하여 좋은 효과를 보인 것으로 보고되었다. 상기의 특허에서 세라마이드 분해 억제제로서 디메칠스핑고신을 사용하여 다양한 항암제와 병행사용한 것으로 보고되었다.

<23> 또한 최근 엠 디 앤더슨(M.D Anderson) 암센터에서 디메칠스핑고신이 약제내성이 생긴 급성 백혈병에 효과가 있는 것으로 보고하였다.

<24> 스팅고신 또는 피토스핑고신 및 그 유도체들은 상기와 같은 기능을 포함한 여러 기능이 보고된 바 있다. 인산화된 스팅고신은 PDGF(platelet derived growth factor)가 관여하는 세포 증식에 대한 전달체(second messenger)이다. 또한 혈소판에 다량 함유되어 있어 혈소판을 활성화시키기도 하고 또 활성화된 혈소판으로부터 나와서 지혈, 혈전증, 상처치료에 관여하는 등 병태생리학적인 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 세포의 운동성을 조절하는 전달체(first messenger)로서 기능을 하기도 한다. 스팅고신은 세라미데이즈(ceramidase)에 의해 생성되는 PKC 억제제로서 암세포의 아폽토시스를 유발시키는 역할을 한다. 메틸화된 스팅고신 중에서 디메칠스핑고신 (*N,N*-dimethylsphingosine)은 세포 내에서 대사적으로 안정한 스팅고신이라 불릴 만큼 그 기능 또한 스팅고신과 유사하다. 하지만 스팅고신보다 더 강력한 PKC 억제제로서 표피암세포, 백혈병 세포 뿐만 아니라 다양한 암세포에 대한 성장을 억제하는 아폽토시스 유발 물질이다. 그리고 혈소판의 활성화 및 인산화된 스팅고신의 유리를 억제하는 영향도 가지고 있다. 트리메틸스핑고신 (*N,N,N*-trimethylsphingosine)은 디메칠스핑고신의 세포 독성과 물에 대한 용해도를 개선한 물질로서 디메칠스핑고신과 비슷하게 강한 PKC 억제효과를 가지고 있다. 하지만 아폽토시스의 기능은 없고 디메칠스핑고신에 비해 스팅고신 인산화 효소를 억제하는

기능 또한 매우 약하다. 그러나 항염의 효과는 탁월한 것으로 알려져 있다(Igarashi, Y. 1997 J. Biochem. 122, 1080-1087). 피토스핑고신은 대사에 대한 연구가 주로 이스트(yeast)를 이용하여 이루어졌으나 이스트 뿐만 아니라 실재로 인체 표피 내에도 존재하는 물질로 밝혀졌으며 PKC 및 PLD(Phospholipase D) 억제 효과가 있고 생체내(in vivo)에서 자외선에 의해 유도되는 염증에 대한 억제 효과가 있는 것으로 확인되었다. 또한 항생제 에리트로마이신(erythromycin)과 비교하여 여드름균(*Propionibacterium acnes*)과 포도상 구균(*staphylococcus aureus*)에 대한 생장 억제 효과가 탁월한 것으로 나타났다(대한민국 특허출원 제2001-15700호 박장서 외 ; 대한민국 특허출원 제2000-74074호 김진옥 외 ; US 특허출원 일련번호 09/691446 Park Changseo et al.).

<25> 그러나 이러한 생리활성 물질인 피토스핑고신은 그 기능면에서는 상당한 주목을 받고 있지만 순수 합성방법으로 제조하기에는 너무 고가여서 경제적으로 사용하는 것이 어려웠다. 또한 합성으로 얻어진 것은 인체 내에 존재하는 스피고지질과는 입체화학적 구조가 다른 경우가 많았으며 추출을 통한 방법 또한 그 기원에 대한 논란이 계속되어 사용하는데 있어 제한이 되어 왔다. 이러한 상황에서 본 발명자들은 이미 모균주 (NRRL Y-1031 (F-60-10))에서 포자분리방법(spore isolation)으로 선별한 균주를 가지고(대한민국 특허등록 제188857호 ; 미국 특허등록 제6,194,196호) 효모 발효를 통해 피토스핑고신을 대량으로 얻는 방법을 개발하였으며(대한민국 특허등록 제221357호 ; 미국 특허등록 제5,958,742호 ; 프랑스 특허등록 제2871502호), 이렇게 얻은 피토스핑고신은 인체 내에 존재하는 스피고지질과는 입체화학적으로 동일한 구조를 가지고 있는 것으로 밝혀져 산업적으로 그 활용도가 점점 높아지고 있다. 이에 대량생산이 가능한 피토스핑고신을 기본 골격으로 한 생리활성 효과가 우수한 다양한 유도체를 개발하게 되었다.



030005603

출력 일자: 2003/5/12

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<26> 본 발명의 목적은 스팽고신키나제의 활성을 억제함으로써 아폽토시스를 유발하는 세라마이드와 스팽고신의 농도를 높게 유지하는 것을 통해 암을 치료 또는 예방하는 것이다. 또한 프로테인키나제의 활성을 억제하고 세포 증식을 촉진하는 스팽고신키나제의 활성을 억제함으로써 과증식성 질환, 예컨대 암과 건선 등을 치료 또는 예방하는 것을 목적으로 하고 있다. 또한 그 자체로도 우수한 아폽토시스 활성을 갖는 조성물을 제공하는 것이다. 또한, 항균, 항염 등의 효능을 갖는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하고 있다.

【발명의 구성 및 작용】

<27> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명에 의한 항암제 조성물은 N,N-디메칠 피토스팡고신을 유효성분으로 함유한 것을 특징으로 한다.

<28> 상기한 항암제 조성물에 있어서, 피토스팡고신, 아세칠화 피토스팡고신 및 에칠화 피토스팡고신으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 피토스팡고신 유도체를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

<29> 상기 N,N-디메칠피토스팡고신 대 상기 피토스팡고신 유도체의 중량비는 가장 바람직하게는 1:1이다.

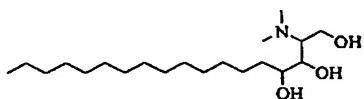
<30> 또한 본 발명에 의한 암 치료용 키트는 상기한 항암제 조성물을 포함하는 것을 특징으로 한다.

<31> 상기한 암 치료용 키트는 상기 항암제 조성물을 다른 항암제의 보조제로서 포함하는 것을 특징으로 한다.

- <32> 또한 본 발명은 N,N-디메칠피토스핑고신을 유효성분으로 함유한 스피고신키나제 억제제 조성물, 아폽토시스 유도 조성물, 프로테인키나제 C 억제제 조성물, 항염제 조성물, 과증식성 질환 치료용 조성물 또는 항균제 조성물인 것을 특징으로 한다.
- <33> 상기한 과증식성 질환 치료용 조성물에 있어서, 상기 과증식성 질환은 건선인 것을 특징으로 한다.

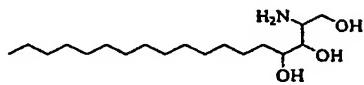
- <34> 본 발명에 의한 조성물이 함유하는 디메칠피토스핑고신의 화학식은 다음과 같다.

<35> 【화학식 1】

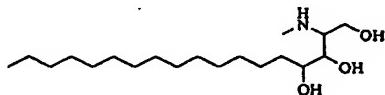


- <36> 상기 화학식 1의 N,N-디메칠피토스핑고신 화합물은 다음과 같은 제조방법에 의해 제조될 수 있다. 하기 화학식 2의 피토스핑고신을 용매 중에서 환원제의 존재 하에 포름알데히드와 반응시켜 하기 화학식 3을 중간물질로 하여 제조한다.

<37> 【화학식 2】



<38> 【화학식 3】





030005603

출력 일자: 2003/5/12

- <39> 상기 제조 방법에 대해 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 단백질의 아민 메틸화 반응을 응용한 환원적 메틸화 반응으로 제조하는 것으로서, 아민의 반응성을 증가시키기 위하여 하이드라이드를 사용하는데 소듐보로하이드라이드가 바람직하게 사용되며 그 양은 화학식 2의 화합물을 기준으로 하여 8.0 내지 10몰 배량 사용하는 것이 바람직하다. 용매는 보레이트 버퍼에 메탄올을 동량 섞어 만든 용매를 사용한다. 37% 포름알데히드 수용액을 일정량씩 시간 간격을 두고 여러 번 가하여 진행시키고 72시간동안 상온 상태에서 반응이 이루어진다.
- <40> 그러나, 본 발명에 따른 방법에서 사용될 수 있는 산화제가 상기 열거된 것 만으로 한정되는 것은 아니고 반응에 영향을 끼치지 않는 범위 내에서는 당업계에 통상적으로 공지된 모든 것이 사용될 수 있다. 또한, 상기 설명한 방법으로 제조된 화학식 1의 화합물은 클로로포름이나 클로로포름/메탄올의 혼합 용매 등의 유기 용매로 추출하고 실리카겔에 의한 흡착크로마토그래피로 정제한다.
- <41> 본 발명에 의한 조성물이 함유하는 디메칠피토스핑고신은 디메칠피토스핑고신에 비해 스피고신키나제 억제효과가 우수하다. 특히 본 발명자들은 디메칠피토스핑고신이 아폽토시스 유발효과, 프로틴키나제 C 억제효과 등이 뛰어나 단독으로도 여러가지 암세포주에서 아폽토시스를 강력히 유발하는 것을 발견하였다.
- <42> 디메칠피토스핑고신은 그대로 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 의약에 사용할 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젖산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 틀루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다.

- <43> 본 발명에 의한 조성물을 제조하기 위하여 디메칠피토스핑고신을 항암제 또는 항암제 치료 증진제의 약제학적 조성물로 제제화할 경우, 유효 성분에 악영향을 미치지 않는 한, 필요에 따라 의약에 사용되는 각종 보조제, 예컨대 담체나 기타 첨가제, 예컨대 안정제, 완화제, 유화제 등을 첨가할 수 있다.
- <44> 또한, 본 발명에 따른 디메칠피토스핑고신 함유 조성물을 비경구, 경구 등으로 투여할 수 있으며, 주사제, 산제, 과립제, 정제 등을 비롯하여 약제학적 제제에 적합한 어떠한 제형으로도 할 수 있다.
- <45> 디메칠피토스핑고신은 단독 또는 다른 피토스핑고신 유도체와 함께 사용될 수 있으며 두 성분의 병용 투여시 함량비는 디메칠피토스핑고신 50 중량%와 기타 피토스핑고신 유도체 50%의 비로 하는 것이 가장 바람직하며, 약제학적 제형에 있어서 상기 복합체의 함유량은 제형에 따라 광범위하게 변할 수 있으며, 통상적인 방법에 따른다. 본 발명에 의한 디메칠피토스핑고신의 바람직한 투여량은 0.001 내지 1000mg / Kg·day이다.
- <46> 본 발명에 의한 조성물은 단독으로 투여되거나 다른 항암제와 동등하게 또는 다른 항암제를 보조하기 위해 함께 투여될 수 있다.
- <47> 이하 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세히 설명하나, 이는 예시의 목적일 뿐 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- <48> 실시예
- <49> <실시예1 : N,N-디메칠피토스핑고신의 제조>

<50> 본 발명자들은 먼저 상기 화학식 1의 N,N-디메칠피토스핑고신을 다음과 같이 제조하였다. 피토스핑고신 2g (0.0063 몰)을 메탄올 200ml에 가하고 40℃에서 교반하여 용해시킨 후, 0.2M 보레이트 완충액(pH 9.0)을 메탄올과 동량으로 천천히 가하고 소니케이션으로 분산시켰다. 그런 다음에 4℃ 아이스 베쓰(ice bath)에서 소듐보로하이드라이드 1g을 조심해서 가하였다. 이 때 끓어오르는 것을 조심하여야 한다. 10분 후 37 % 포름알데히드 수용액을 10ml씩, 5분 간격으로 6번씩 가하였다. 24시간 후 같은 방법으로 소듐보로하이드라이드를 한번 더 가하였다. 반응은 실온에서 72시간동안 진행시켰다. 72시간이 경과된 후 클로로포름을 100ml를 가하고 중류수로 추출함으로서 반응을 멈추었다. 그런 다음에 실리카겔에 의한 흡착크로마토그래피로 정제하여 상기 화학식 1의 화합물을 얻었다. 실리카겔 박층 크로마토그래피 (TLC)로 정제 (클로로포름, 메탄올, 암모니아수 = 80 : 20 : 2, $R_f = 0.6$)하여 백색의 화학식 1의 화합물 1.5 g (수율 68.9 %)을 얻었다. 도 1에서 보는 바와 같이 ^1H NMR로 메틸기가 두 개 도입된 것 (=2.4 ppm, s, 6H)을 확인하였고 도 2에서 보는 바와 같이 MALDI-MASS로 분자량(계산치 : 346.32, 측정치 : 346.46)을 측정하여 확인하였다.

<51> <실시예 2 : N,N-디메칠피토스핑고신의 스팅고신키나제 활성 억제>

<52> 본 발명자들은 본 발명에 의한 조성물이 스팅고신키나제 활성 억제 효과를 갖는다는 것을 입증하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

<53> 본 발명에 의한 디메칠피토스핑고신의 효과를 디메칠스핑고신과 비교하기 위하여 디메칠스핑고신에 대하여도 동일한 실험을 하였다. 스팅고신키나제의 활성을 측정하기

위하여 스팽고신키나제 특정용 완충용액(Sphingosine kinase assay buffer)을 다음의 조성으로 제조하였다: 20mM Tris 버퍼, pH 7.2, 10mM MgCl₂, 20% 글리세롤, 1mM 디티오프레이톨(dithiothreitol), 1mM Na₃VO₄, 15mM NaF, 10g/ml 륬펩틴(leupeptin) 및 아프로티닌(aprotinin), 1mM PMSF 및 0.5 mM 4-데옥시피리독신(deoxypyridoxine).

<54> 반응량은 200ul로 하였으며 0.25% Triton X-100에 용해시킨 50uM의 각각의 디메칠스파고신 및 디메칠피토스파고신, 마우스 유래의 스팽고신키나제 10ng과 1mM [³²P] ATP를 넣고 37°C에서 20분동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 1N HCl을 20~50 ul을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응을 정지한 후 1ml의 클로로포름(Chloroform)을 넣어 지질을 분리정제하고 질소가스 하에서 건조시켰다. 신틸레이션 계수기(scintillation counter)를 이용하여 방사선 동위원소를 측정하여 생성된 스팽고신-1-포스페이트(Sphingosine-1-phosphate)를 측정하여 스팽고신키나제에 대한 억제효과를 확인하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타낸 그래프의 X축은 CPM를 Y축은 농도(uM)를 나타낸다. 도 3에 나타난 바와 같이, 디메칠피토스파고신은 디메칠피토스파고신에 비해 강력한 스팽고신키나제 억제효과를 가지는 것을 알 수 있으며, 이는 스팽고신키나제를 직접 저해한다는 것을 암시하는 것이다.

<55> <실시예3 : HL60 세포에서의 N,N-디메칠피토스파고신의 아폽토시스 유발 효과>

<56> N-N-디메칠피토스파고신의 아폽토시스(apoptosis) 유발효능을 검사하였다. 항암효과는 그 작용기전과 화학구조에 따라 세포 내 다양한 신호전달경로를 거치게 되지만 결과적으로는 암세포를 분열하기보다는 스스로 괴사하게 하는 아폽토시스를 일으킨다. 암세포에 대한 N-N-디메칠피토스파고신의 항암 효과를 검사하기 위하여 먼저 세포독성 정도를 측정했으며 그 결과를 토대로 아폽토시스를 확인하였다:

<57> 실험은 MTT 분석(assay) 방법으로 측정하였다. MTT

(3-[4,5-Dimethylthiazol-2y1]-2,5-diphenyltetrazolium)은 배지에 용해시 노란색을 띤 염색시약이나 이는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내에 활성을 띤 디히드로게나제(dehydrogenase)라는 효소에 의해 보라색 포마잔(formazan)으로 변색한다. 따라서 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 보라색으로 변색이 줄어들게 되며 그 정도를 흡광도를 통해 측정하게 된다. HL60 세포주를 적정한 농도로 96-웰 플레이트에 시딩(seeding)하여 37°C, 5%의 CO₂ 배양기에 24시간동안 배양하였다. 배양 후, 아폽토시스 효과를 테스트할 각 시료(피토스핑고신, C2 피토세라아미??, 테트라아세칠피토스핑고신, C6 피토세라마이드, C8 피토세라마이드, C3 세라마이드, 스팅가닌, 디메칠스핑고신 및 디메칠프토스핑고신)를 무혈청(serum free) RPMI에 희석하여 0.5M ~ 50 M의 농도로 세포에 처리하여 24 시간동안 배양하였다. 최종 농도가 0.5 mg/ml인 MTT를 각 웰에 넣어 3시간동안 더 배양한 후 피펫으로 염색시약을 용해한 뒤에 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

<58> 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신은 HL60 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있으며, 따라서 아폽토시스 유발로 인한 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 도 4에 표시된 약자들은 다음을 의미한다.

<59> PS : 피토스핑고신 C2-PCER : C2 피토세라마이드(엔아세칠피토스핑고신)

<60> TAPS : 테트라아세칠피토스핑고신 C6-PCER : C6 피토세라마이드,

<61> C8-PCer : C8 피토세라마이드, C2-Cer : C2세라마이드,

<62> Sphinganine : 스팅가닌 DMS : 디메칠스핑고신

<63> DMPS : 디메칠피토스평고신

<64> <실시예4 : HaCaT 세포에서의 N,N-디메칠피토스평고신의 아폽토시스 유발 효과>

<65> 아폽토시스를 유발할 세포주로서 HaCaT 세포를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시 예3과 동일한 방법으로 실험하였다. 그 결과는 도5에 나타내었다.

<66> 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스평고신은 HaCaT 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있으며, 따라서 아폽토시스 유발로 인한 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 특히 디메칠피토스평고신에 비해 그 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 도 5에 표시된 약자들은 상기 실시예3에서 설명한 바와 같다.

<67> <실시예5 : LLC-PK1 세포에서의 N,N-디메칠피토스평고신의 아폽토시스 유발 효과>

<68> 아폽토시스를 유발할 세포주로서 LLC-PK1 세포를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예3과 동일한 방법으로 실험하였다. 그 결과는 도6에 나타내었다.

<69> 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스평고신은 LLC-PK1 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있으며, 따라서 아폽토시스 유발로 인한 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 특히 디메칠피토스평고신에 비해 그 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 도 5에 표시된 약자들은 상기 실시예3에서 설명한 바와 같다.

<70> <실시예6 : B104 세포에서의 N,N-디메칠피토스평고신의 아폽토시스 유발 효과>

- <71> 아폽토시스를 유발할 세포주로서 B104 세포를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예3과 동일한 방법으로 실험하였다. 그 결과는 도7에 나타내었다.
- <72> 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신은 B104 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있으며, 따라서 아폽토시스 유발로 인한 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 특히 디메칠피토스핑고신에 비해 그 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 도 7에 표시된 약자들은 상기 실시예3에서 설명한 바와 같다.
- <73> <실시예7 : MDA-MB-231 세포에서의 N,N-디메칠피토스핑고신의 아폽토시스 유발 효과>
- <74> 아폽토시스를 유발할 세포주로서 MDA-MB-231 세포를 이용한 것을 제외하고는 상기 실시예3과 동일한 방법으로 실험하였다. 그 결과는 도8에 나타내었다.
- <75> 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신은 MDA-MB-231 세포에서 세포사멸을 유도하는 것을 알 수 있으며, 따라서 아폽토시스 유발로 인한 항암효과가 있는 것으로 판단된다. 특히 디메칠피토스핑고신에 비해 그 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 도 8에 표시된 약자들은 상기 실시예3에서 설명한 바와 같다.
- <76> <실시예8: N,N-디메칠피토스핑고신의 DNA 단편화 실험>
- <77> 세포독성을 보인 농도 수준에서 아폽토시스의 대표적인 특징인 DNA 단편화를 검사하였다. 아폽토시스는 세포의 계획된 괴사로 형태학적인 변화뿐만 아니라 크로마틴(chromatin) 응축, 아폽토틱 바디(apoptotic body) 형성 등 복잡한 생물학적 특징들이

나타나게 되나 본 실험에서는 그 중에서도 DNA의 단편화를 보았다. HL-60 cell을 110^7 셀/10ml의 수로 시딩(seeding)하여 37°C , 5% CO_2 의 배양기에 24시간동안 배양한 후 N,N-디메칠피토스핑고신과 대조군으로 사용한 물질들을 도 9에서 지시한 농도 하에서 처리하여 24시간동안 배양하였다. 모든 물질은 에탄올에 녹였다. 세포를 원심분리를 통해 회수하였으며 용균 버퍼(lysis buffer) (5mM Tris-HCL(pH 7.4), 20mM EDTA, 0.5% Triton X-100)를 가하여 세포막을 파쇄하였다. 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 한 후, 잘 려진 DNA 단편들이 용해되어 있는 상층액을 회수하였다. 상층액과 동량의 폐놀을 첨가하여 볼텍싱(vortexing)한 후 12,000 rpm으로 10분 동안 다시 원심분리를 한 후 상층액을 조심스럽게 회수하였다. 폐놀:클로로포름:이소아밀알코올(25:24:1) 또는 클로로포름을 통한 DNA 추출법도 위의 폐놀방법과 똑같이 이뤄졌다. 여러 용매 처리를 통해 얻어진 상층액에 0.3 M 아세트산 나트륨(sodium acetate), pH 5.2 가 용해된 에탄올을 첨가하여 하루동안 20°C 의 냉동고에서 침전시켰다. 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 한 후, 얻어진 DNA 펠릿만 남기고 위의 상층액은 따라 버리고 70% 에탄올을 넣어 쟁여주었다. 다시 원심분리 후 상층액은 버리고 남겨진 DNA 절편을 TE 버퍼에 녹였다. DNA 절편들 외에 존재 가능한 RNA를 제거하기 위해 0.5 mg/ml RNase를 1:1 넣고 37°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 1.2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 DNA 단편화를 확인하였다. 그 결과는 도 9에 나타내었다. 도 9에서 보는 바와 같이, 단쇄(short-chain) 세라마이드 중 하나인 N-아실 스팕고신(C2-세라마이드)이 25.0 μM 농도에서 DNA의 단편화 현상이 나타난다. N-acyl sphingosine은 아폽토시스 유발 물질로서 알려져 있으며 DNA의 단편화 현상은 이러한 효능에 대한 한 예이다. 마찬가지로 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신이 같은 농도에서 DNA의 단편화 현상이 일어남을 확인할 수 있었다. 특이한 점은 N,N-디메칠

피토스핑고신은 대조군으로 사용한 C2-세라마이드보다도 더 낮은 농도에서 사다리 모양처럼 명백한 DNA 단편화 현상이 나타났고 그 정도가 더 강하게 나타났다는 것이다. 따라서 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신은 N-아실스핑고신에 비해 아폽토시스 유발 효과가 더 우수한 것으로 판단된다. 스피고신세라마이드의 일종인 CLA 세라마이드는 같은 농도에서 DNA 단편화 현상이 보이지 않았다.

<78> 도9에 나타낸 기호는 다음을 의미한다.

<79> SM : DNA 사이즈 마커(size marker)

<80> EtOH : 에탄올(Ethanol)

<81> 1 : DMPS 12.5 uM

<82> 2 : DMPS 25.0 uM

<83> 3 : DMPS 50.0 uM

<84> 4 : C2 ceramide 25.0 uM

<85> 5 : C2 ceramide 50.0 uM

<86> 6 : CLA ceramide 25.0 uM

<87> 7 : CLA ceramide 50.0 uM

<88> <실시예 9 : N,N-디메칠피토스핑고신의 안티-히스톤 항체 결합에의 효과>

<89> 본 실험은 ELISA의 원리를 이용한 것이다. 즉, 단일가닥(single-stranded) 혹은 이중가닥(double-stranded) DNA와 히스톤(Histones : H2A, H2B, H3 및 H4)에 대한 특이적 단일클론(monoclonal) 항체들을 이용하여 세포질내 분해된 핵산의 모노 혹은 올리고좀을

검출할 수 있다. 아폽토시스가 일어난 세포는 Ca²⁺와 Mg²⁺에 의존적인 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 활성시키고 이 효소는 근접하는 이중가닥(double stranded) DNA를 분해하여 모노 혹은 올리고좀을 만든다. 그로인해 핵내에서 DNA와 단단하게 결합되었던 히스톤들은 밖으로 표출된다.

<90> 우선 안티-히스톤(anti-histone) 항체를 96웰에 고정시켰다. 코팅용액(coating solution), 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 이후 각 시료를 처리하여 얻어진 세포 분해물의 세포질내 발생한 뉴클레오좀에 존재하는 히스톤 성분(histone component)을 안티-히스톤 항체(anti-histone antibody)가 고정된 96웰에 부착시켰다. 이는 15~25°C에서 90분간 시행하였다. 그리고 안티-DNA-퍼옥시다제(anti-DNA-peroxidase) (POD)가 세포질내 뉴클레오좀의 DNA부분과 결합하도록 하였다. 이는 상온에서 90분간 시행하였다. 결합하지 못한 퍼옥시다제 컨져게이트(peroxidase conjugate)를 세척하고 기질인 ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate])를 첨가한 후 10 ~ 20분간 반응시키고 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

<91> 도 10에 나타난 바와 같이, DMPS의 경우에 다른 대조군들에 비해 흡광도 (A405nm-A490nm)가 큰 것을 알 수 있으며, 이는 모노 또는 올리고좀이 가장 많이 증가한 것이므로 다른 시료들에 비해 핵산의 단편화(DNA fragmentation)를 많이 유발한 것으로 해석할 수 있다. 핵산의 단편화가 많이 발생하였다는 것은 아폽토시스가 많이 발생한 것을 입증한 것이다.

<92> 상기 실시예 3 내지 9의 결과에 따르면, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신은 면역세포주, 피부암 세포주, 멜라노사이트, 폐암세포주, 및 유방암세포주 모두에서 세

포사멸을 유도하는 것으로 나타났으며 다른 스팽고지질 유도체들에 비해서 본 발명에 의한 디메칠피토스핑고신은 암세포주에 대한 독성이 가장 뛰어난 것으로 나타났다.

<93> <실시예 10: N,N-디메칠피토스핑고신의 PKC 억제 효과>

<94> 본 발명자들은 쥐의 피부 표피세포를 사용하여 N,N-디메칠피토스핑고신의 프로테인 키나제 C(PKC) 억제효과에 대해 알아보았다. 표피세포를 2×10^7 세포/ml이 되도록 배양한 후 N,N-디메칠피토스핑고신 및 기타 스팽고지질 유도체들의 각 함량이 100uM, 400uM 이 되도록 첨가한 후 반응시켰다. 상기의 세포를 PBS로 세척한 후 호모게나이저로 세포를 파쇄하였다. 세포의 파쇄액을 원심분리하고 상등액을 DE52 칼럼을 통과시키면서 프로테인 키나제 C를 함유하는 부분을 얻었다. 활성화된 PKC 반응을 위해 PKC 코액티베이션(coactivation) 5X buffer, PKC 액티베이션(activation) 5X 버퍼, PKC 비오틴화된 웨티드 기질(biotinylated peptide substrate), (32P)ATP 믹스(mix)를 각각 5ul를 첨가한 튜브와 대조 반응을 보기 위해 PKC 코액티베이션(coactivation) 5X 버퍼, 콘트롤 5X 버퍼, PKC 비오틴화된 웨티드 기질(biotinylated peptide substrate), (32P)ATP 믹스를 각각 5ul 함유한 튜브를 준비하고 각각에 5ul의 효소를 첨가한 후 30°C에서 5분간 반응하였다. 반응 후 12.5ul의 반응정지 용액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 10ul를 SAM2TM 멤브레인에 떨어뜨린 후 2M NaCl로 30초간 1회, 2M NaCl로 2분간 3회, 1% H₃PO₄ 와 2M NaCl용액에 2분간 4회, 중류수로 30초간 2회 세척한 후 건조한 후 방사성 동위원소를 측정하여 PKC 저해효과를 측정하였다. 그 결과는 도 11에 나타나 있다. 도 11에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 N,N-디메칠피토스핑고신이 가장 PKC 저해효과가 높은 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명에 의한 조성물은 항염 효과가 있는 것으로 판단된다.

<95> <실시예 11: N,N-디메칠피토스핑고신의 항균 활성>

<96> 본 발명자들은 N,N-디메칠피토스핑고신의 항균활성을 테스트하기 위하여 그람 양성균인 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*), 그람 음성균인 대장균(*E. coli*)을 이용하여 항균 활성을 알아보기 위한 실험을 수행하였다. 이 때 사용한 배지는 LB(박토펩톤 10g/L, 효모 추출물 5 g/L, 염화나트륨 10g/L) 또는 TS(트립톤 15g/L, 소이 톤 5 g/L, 염화나트륨 5g/L)를 가압 살균하여 이용하였으며 30°C 또는 37°C에서 2-3일간 배양하였다. 배양이 끝난 후 균수를 측정하여 항균력을 검사하였다. 본 발명에 사용한 N,N-디메칠피토스핑고신은 에탄올에 녹여 사용하였으며 항균 효과를 파악하기 위해서는 1ug/ml, 5ug/ml, 100ug/ml, 1,000ug/ml의 농도로 사용하였다. 각각의 미생물을 배양하여 10 배씩 순차적으로 희석하여 각각의 배양 배지에 도말하여 배양한 후 한 평판 배지 당 약 30 ~ 300개의 집락을 형성하는 희석배수를 결정하였다. 각각의 미생물을 배양한 후 상기의 실험에서 결정된 희석배수로 희석하였다. 이때 희석용액으로는 0.85% NaCl을 사용한다. 상기 방법으로 준비한 시료를 시료준비에 사용한 용매에 순차적으로 희석하여 원하는 농도를 만든 후 희석한 시료를 9ml의 미생물 희석용액에 1ml 첨가하고 충분히 혼합하였다. 30°C 또는 37 °C에서 1시간 방치한 후 (가끔 혼합해줌) 배지에 100 ul씩 도말한 후 각각의 배양조건에서 배양하고 배양이 끝난 후 집락의 수를 측정하였다. 그 결과는 도 12에 나타내었다.

<97> 도 12에서 보는 바와 같이, 대장균(*E. coli*)과 바실러스 리체니포르미스(*B. licheniformis*)에서 모두 그 콜로니의 수가 줄었으며 1 ug/L라는 적은 양으로 콜로니의 양이 40%까지 줄었음을 알 수 있다.



030005603

출력 일자: 2003/5/12

【발명의 효과】

<98> 본 발명에 의한 조성물을 이용하면, 스팽고신키나제의 활성을 억제할 수 있으므로 스팽고신키나제가 유발하는 많은 메커니즘을 차단할 수 있다. 예컨대 스팽고키나제에 의해 세라마이드와 스팽고신이 인산화되는 것을 막음으로써 세라마이드와 스팽고신의 농도를 높게 유지할 수 있고 그러한 세라마이드와 스팽고신에 의해 암세포에서 아폽토시스가 유발되므로 암을 치료 또는 예방할 수 있다. 또한 스팽고신키나제의 세포 증식 촉진 활성을 억제함으로써 과증식성 질환, 예컨대 암과 건선 등을 치료 또는 예방할 수 있다. 또한 본 발명에 의한 조성물은 프로테인키나제 C의 활성을 억제함으로써 프로테인키나제 C가 유발하는 많은 메커니즘을 차단할 수 있다. 그 중에서도 특히 염증을 억제하는 효과가 우수하므로 다른 항암제와 조합하여 투여하는 경우 우수한 항암효과를 기대할 수 있다. 또한 본 발명에 의한 조성물은 그 자체로도 우수한 아폽토시스 활성을 갖기 때문에 아폽토시스가 요구되는 상황에서 단독으로도 이용될 수 있다. 또한, 본 발명에 의한 조성물은 항균 활성이 우수한 효과가 있다.



030005603

출력 일자: 2003/5/12

【특허청구범위】

【청구항 1】

N,N-디메칠피토스핑고신을 유효성분으로 함유한 항암제 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 피토스핑고신, 아세칠화 피토스핑고신 및 에칠화 피토스핑고신으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 피토스핑고신 유도체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

【청구항 3】

제2항에 있어서, 상기 N,N-디메칠피토스핑고신 대 상기 피토스핑고신 유도체의 중량비는 1:1인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

【청구항 4】

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 항암제 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 키트.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 상기 암 치료용 키트는 상기 함암제 조성물을 다른 항암제의 보조제로서 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 키트.

【청구항 6】

N,N-디메칠피토스핑고신을 유효성분으로 함유한 스팅고신키나제 억제제 조성물.

【청구항 7】

N,N-디메칠피토스狞고신을 유효성분으로 함유한 아폽토시스 유도 조성물.

【청구항 8】

N,N-디메칠피토스狞고신을 유효성분으로 함유한 프로테인키나제 C 억제제 조성물.

【청구항 9】

N,N-디메칠피토스狞고신을 유효성분으로 함유한 항염제 조성물.

【청구항 10】

N,N-디메칠피토스狞고신을 유효성분으로 함유한 과증식성 질환 치료용 조성물.

【청구항 11】

제10항에 있어서, 상기 과증식성 질환은 건선인 것을 특징으로 하는 과증식성 질환 치료용 조성물.

【청구항 12】

N,N-디메칠피토스狞고신을 유효성분으로 함유한 항균용 약제학적 조성물.

【청구항 13】

N,N-디메칠피토스狞고신 화합물의 제조방법으로서,

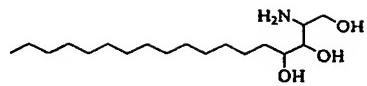
하기 화학식 2의 피토스狞고신을 용매 중에서 환원제의 존재 하에 포름알데히드와 반응시켜 하기 화학식 3을 중간물질로 하여 제조하는 것을 특징으로 하는 방법.

[화학식 2]

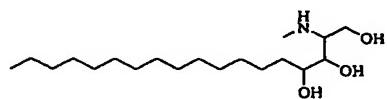


030005603

출력 일자: 2003/5/12



[화학식 3]

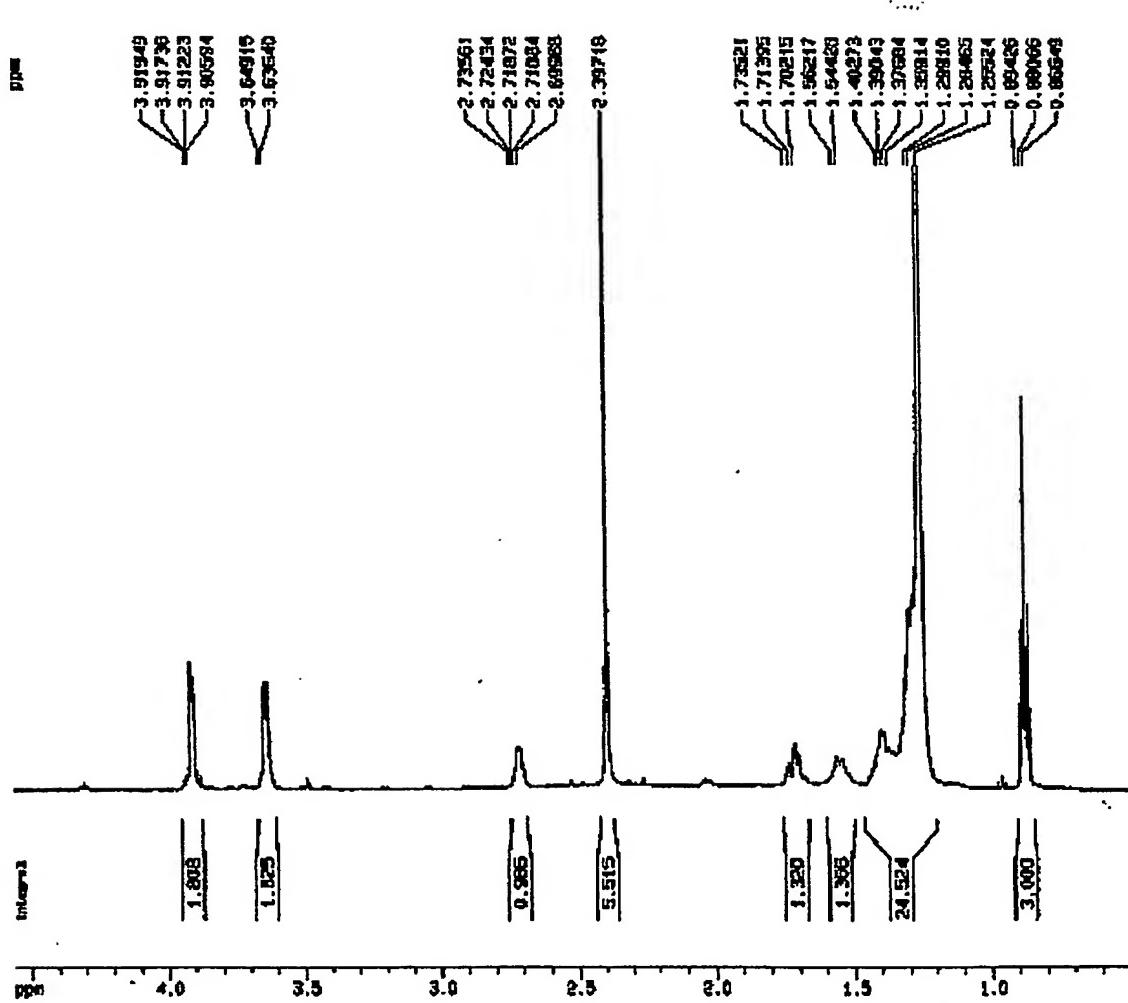


030005603

출력 일자: 2003/5/12

【도면】

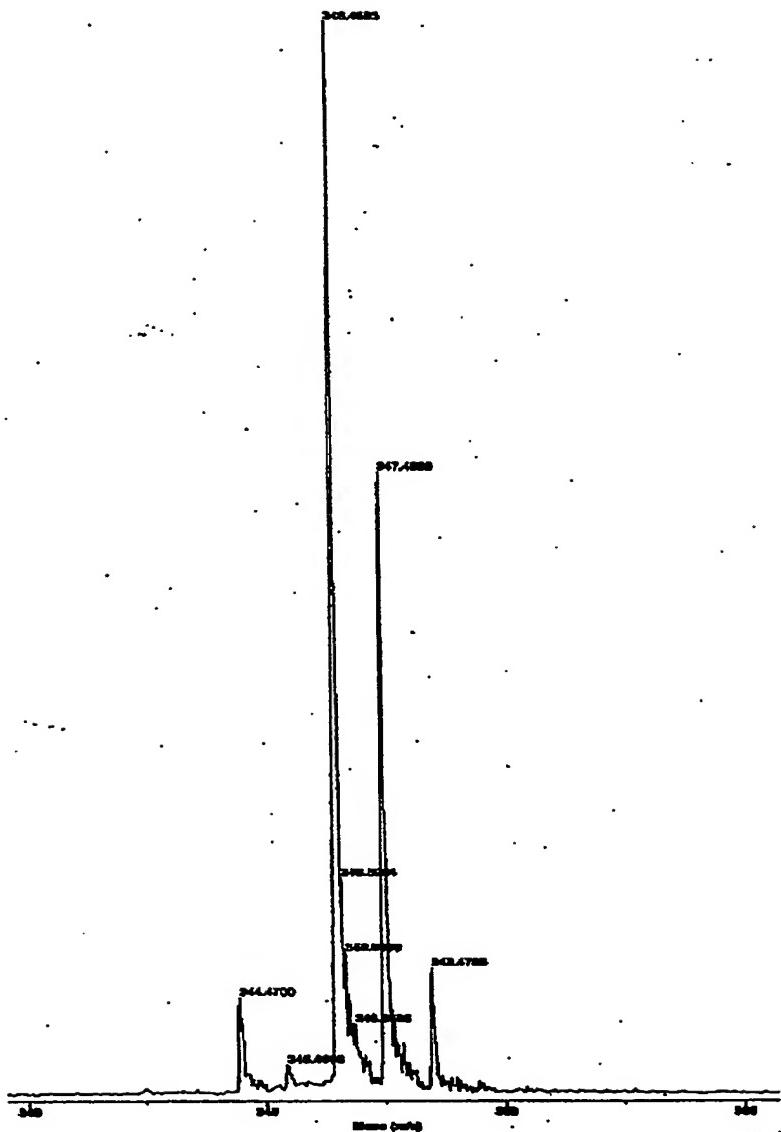
【도 1】



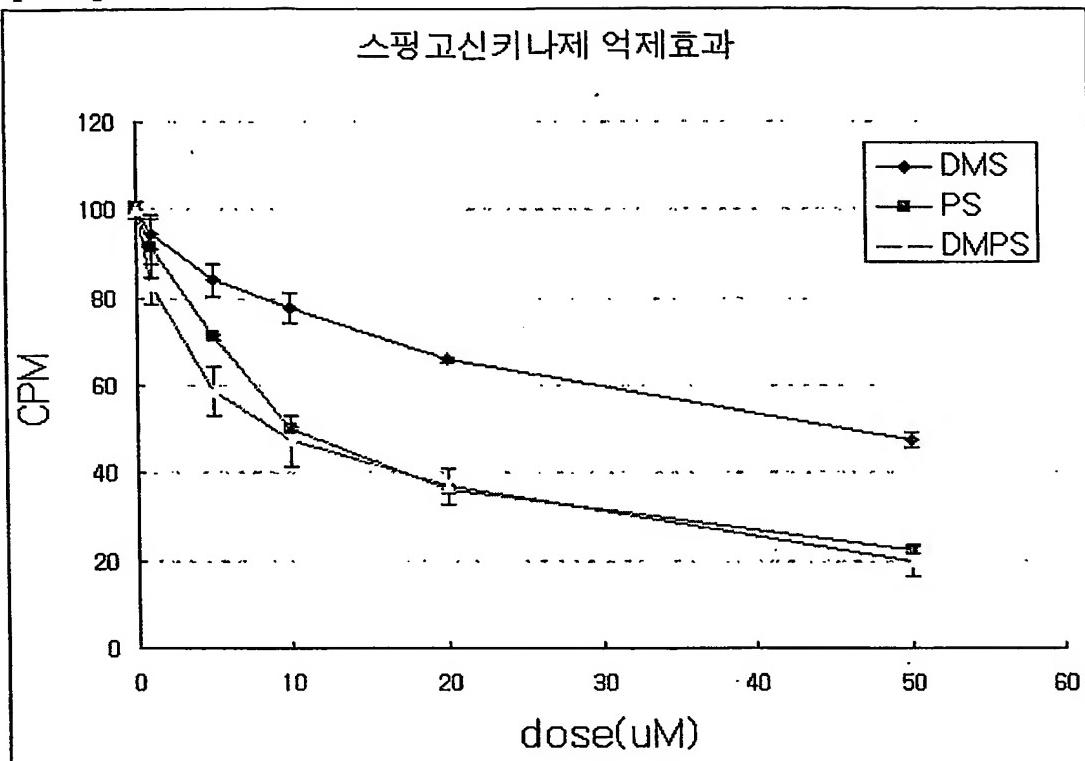
030005603

출력 일자: 2003/5/12

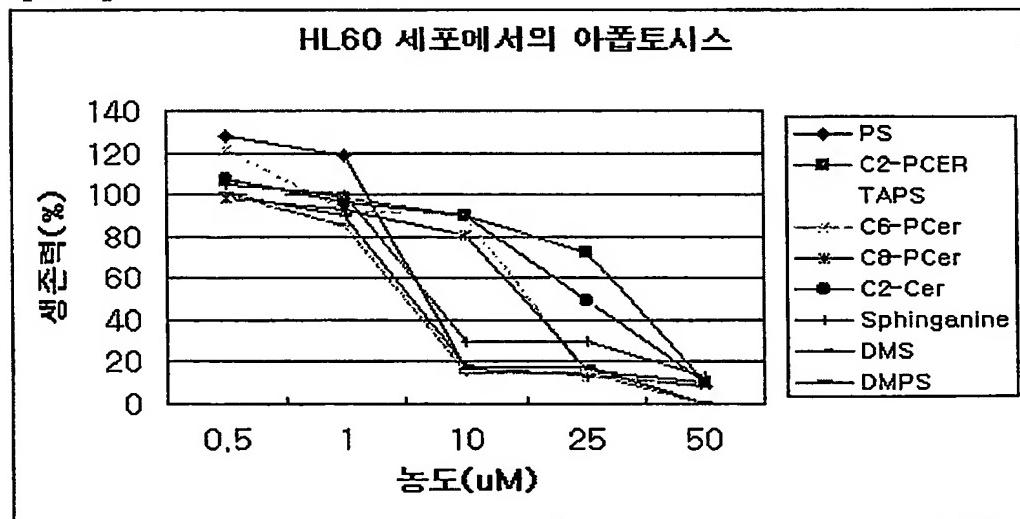
【도 2】



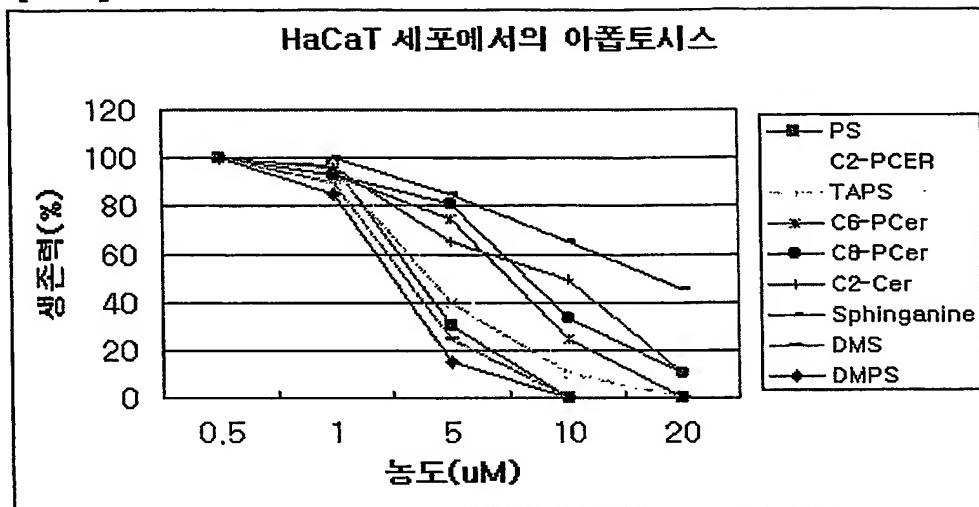
【도 3】



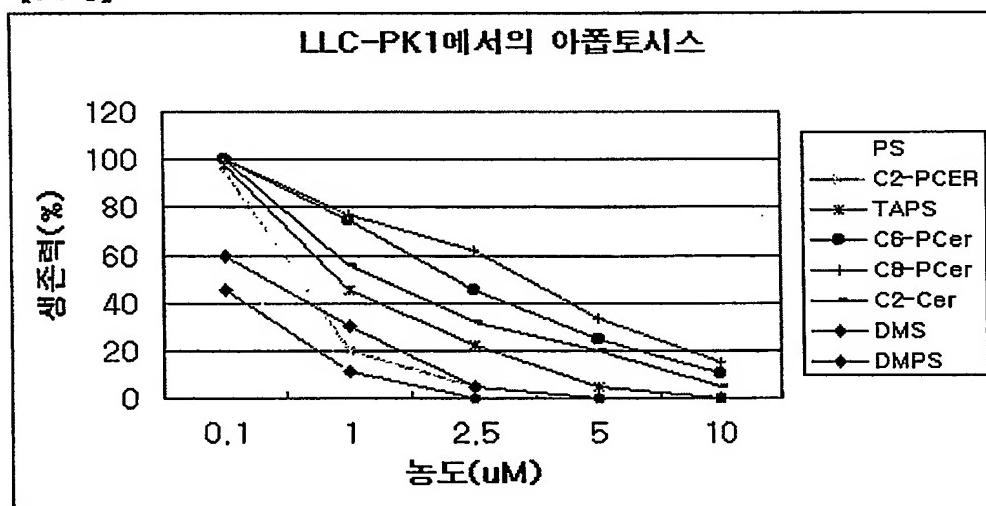
【도 4】



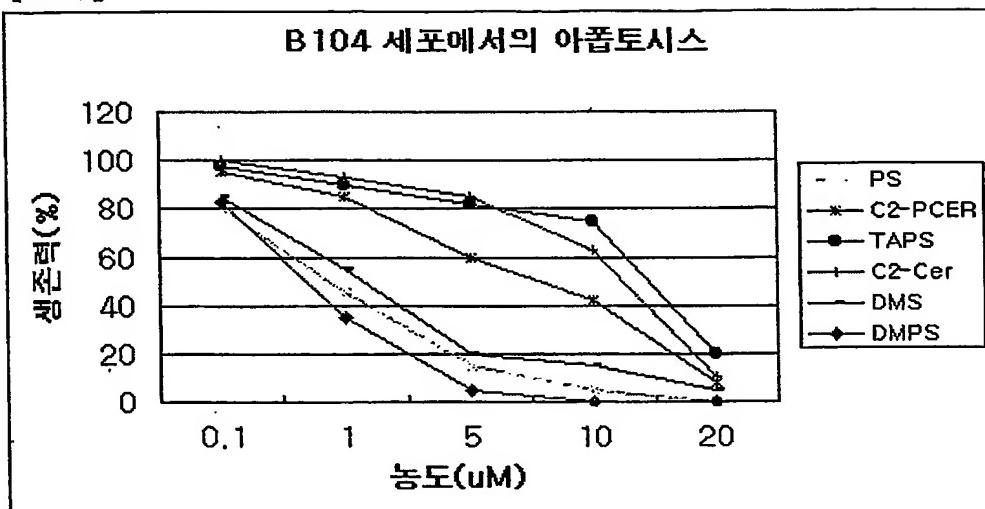
【도 5】



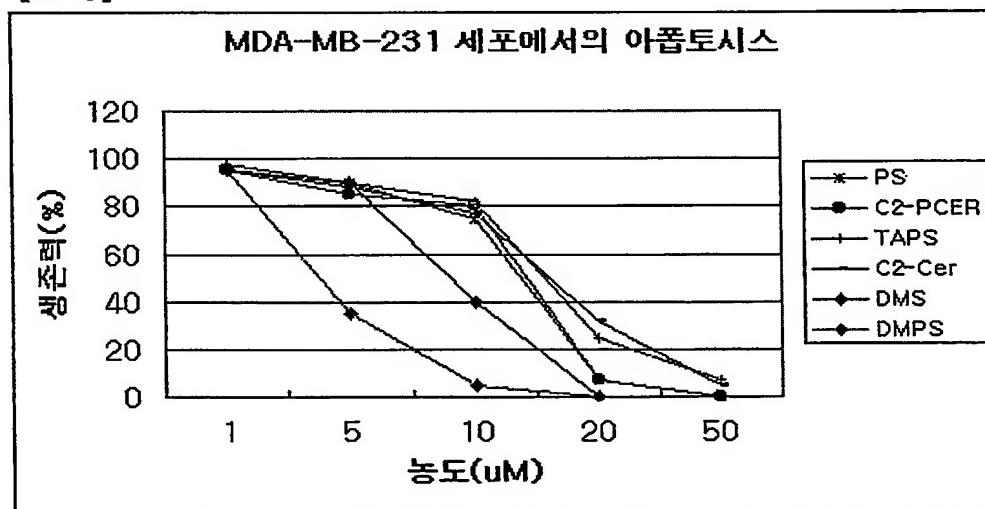
【도 6】



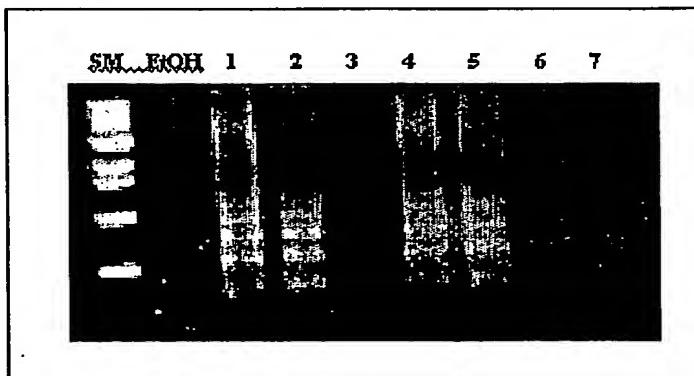
【도 7】



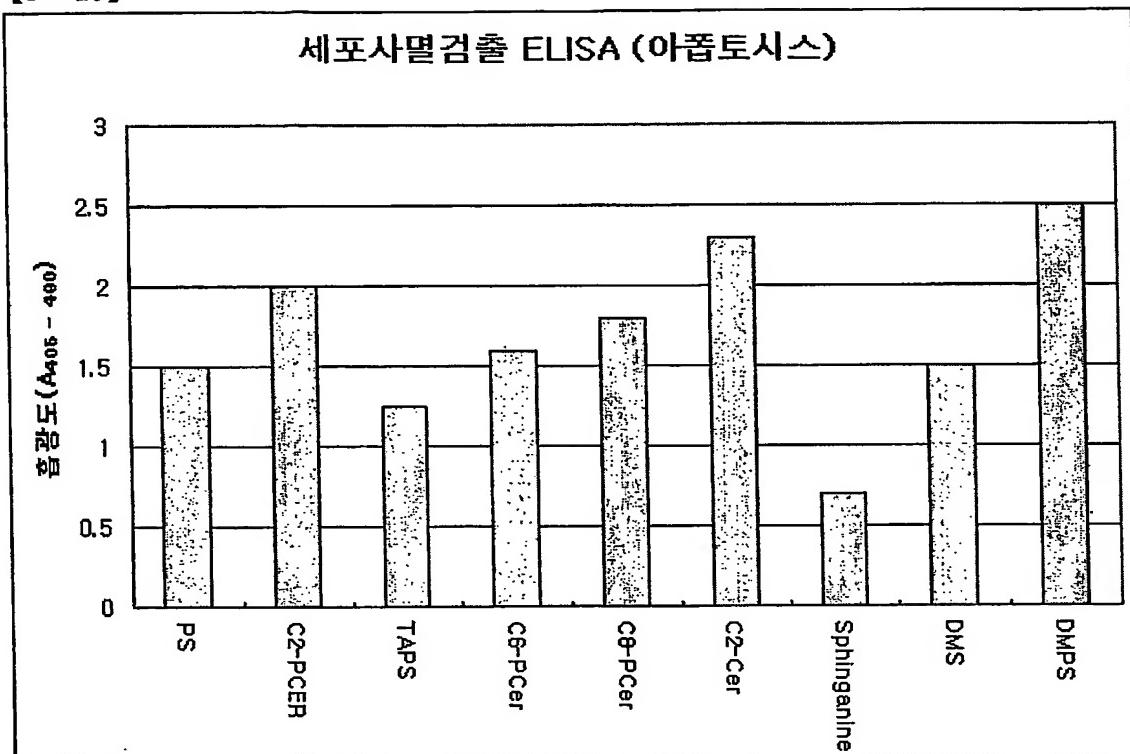
【도 8】



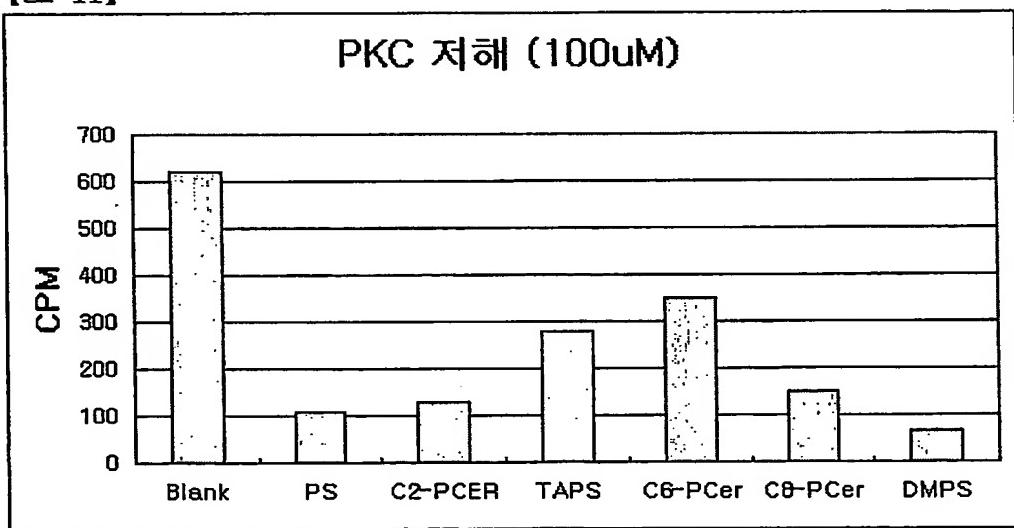
【도 9】



【도 10】



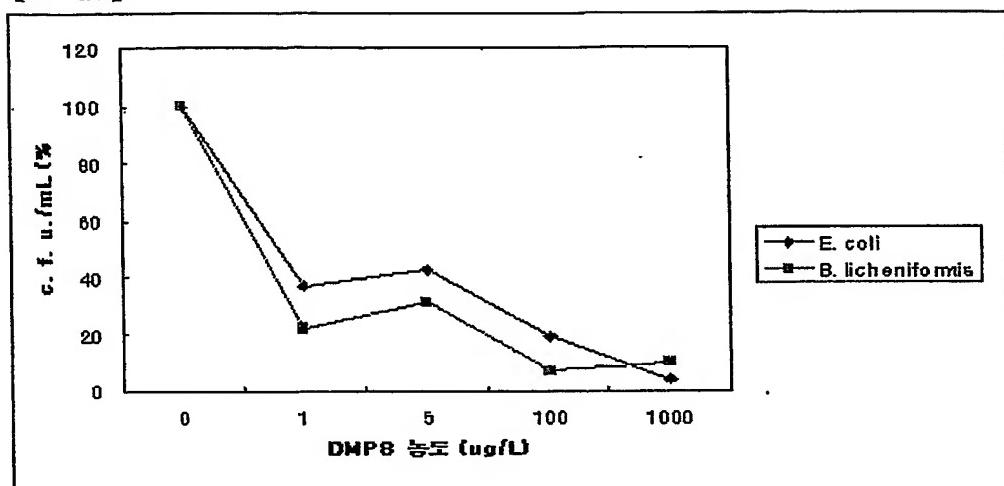
【도 11】



030005603

출력 일자: 2003/5/12

【도 12】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.